



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

JAIZA SAMARA MACENA DE ARAÚJO

INFLUÊNCIA DO CONGELAMENTO E DO TIPO DE MUCOSA EM MODELO DE
PERMEAÇÃO DE FÁRMACO.

Piracicaba

2018

JAIZA SAMARA MACENA DE ARAÚJO

INFLUÊNCIA DO CONGELAMENTO E DO TIPO DE MUCOSA EM MODELO DE
PERMEAÇÃO DE FÁRMACO.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Odontologia, na área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Volpato

Co-orientadora: Profa. Dra. Michelle Franz-Montan Braga Leite

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA JAIZA
SAMARA MACENA DE ARAÚJO,
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARIA
CRISTINA VOLPATO E CO-ORIENTADA
PELA PROFA. DRA. MICHELLE FRANZ-
MONTAN BRAGA LEITE.

Piracicaba

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 132445/2016-6

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

Ar15i Araújo, Jaiza Samara Macena de, 1990-
Influência do congelamento e do tipo de mucosa em modelo de permeação de fármaco / Jaiza Samara Macena de Araújo. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Maria Cristina Volpato.
Coorientador: Michelle Franz Montan Braga Leite.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Condutividade elétrica. 2. Lidocaína. 3. Mucosa bucal. 4. Mucosa esofágica. 5. Administração tópica. I. Volpato, Maria Cristina, 1962-. II. Franz-Montan, Michelle, 1982-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Influence of freezing and type of mucosa on permeation model of drugs

Palavras-chave em inglês:

Electric conductivity

Lidocaine

Mouth mucosa

Esophageal mucosa

Administration, topical

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestra em Odontologia

Banca examinadora:

Maria Cristina Volpato [Orientador]

Camila Batista da Silva de Araujo Candido

Cleiton Pita dos Santos

Data de defesa: 26-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 26 de Fevereiro de 2018, considerou a candidata JAIZA SAMARA MACENA DE ARAÚJO aprovada.

PROF^a. DR^a. MARIA CRISTINA VOLPATO

PROF. DR. CLEITON PITA DOS SANTOS

PROF^a. DR^a. CAMILA BATISTA DA SILVA DE ARAUJO CANDIDO

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Marcelo Knobel.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP), na pessoa de seu diretor Prof. Dr. Guilherme Elias Peçanha Henriques.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas da FOP-UNICAMP, na pessoa de seu Chefe Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo.

À Coordenadoria Pós-Graduação (CPG) da FOP-UNICAMP, na pessoa de sua coordenadora Profa. Dra. Cinthia Maria Tabchoury.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) da FOP-UNICAMP, na pessoa de seu coordenador Prof. Dr. Marcelo de Castro Meneghim.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Mestrado pesquisa concedida (Processo 132445/2016-6).

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro (2012/06974-4) para a realização deste trabalho.

À Sra. Érica Alessandra Sinhoreti, à Sra. Ana Paula Carone e à Sra. Raquel Quintana Sachi, membros da CPG da FOP-UNICAMP, e à Srta. Elisa dos Santos, secretária do PPGO da FOP-UNICAMP pela cordialidade, solicitude e presteza de seus serviços.

À Profa. Dra. Maria Cristina Volpato e à Profa. Dra. Michele Franz-Montan Braga Leite pelas brilhantes orientações, pela paciência e confiança em mim depositadas.

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, pela contribuição valerosa na análise dos dados e estatística.

Aos colegas de laboratório, Me. Bruno Vilela Muniz, pelo auxílio técnico e científico, Lic. Fábio Vinícius Borges Padilha e Me. Klinger de Souza Amorim pelo suporte e diligência durante a realização deste trabalho.

À minha família, aos amigos, aos professores e aos colegas, que me ofereceram suporte durante o desenvolvimento desta pesquisa e apoio necessário para o meu aprendizado ao longo do meu curso de mestrado.

RESUMO

Ensaio de permeação são importantes para o desenvolvimento de formulações tópicas administradas através da mucosa bucal. Comumente, os epitélios jugal e esofágico suínos são utilizados como barreira para estes estudos, além disso, o congelamento e armazenamento destes tecidos é frequente, entretanto ainda não há estudos conclusivos a respeito da viabilidade de ampla realização desta prática. Desta forma, o presente estudo avaliou os parâmetros de permeação de hidrogel de cloridrato de lidocaína através dos epitélios jugal e esofágico de suínos nas condições de tecido fresco e congelado, visando esclarecer se o congelamento altera o perfil de permeação e se o epitélio jugal pode ser substituído pelo esofágico em ensaios de permeação. Após separação da mucosa os epitélios jugal e esofágico foram avaliados quanto à resistividade elétrica para avaliação da integridade, sendo uma parte utilizada imediatamente para permeação e os demais congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e armazenados por 3 semanas. Após esse período, os epitélios foram descongelados e reavaliados quanto à resistividade e submetidos aos ensaios de permeação. Foram utilizados apenas epitélios que apresentaram resistividade pré-congelamento $\geq 3\text{ K}\Omega/\text{cm}^2$. Os ensaios de permeação foram realizados em célula de difusão vertical tipo Franz, durante 1 hora, a 37°C , sob agitação constante, em condição *sink*, sendo a quantificação feita em intervalos de 10 min, por Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (CLAE). Foram calculados o tempo necessário para permeação inicial do anestésico (*lag time*), o fluxo e a quantidade de fármaco permeado (*Q-total*). Os resultados obtidos, para as condições fresco e congelado, foram respectivamente: resistividade (média \pm DP; $\text{K}\Omega/\text{cm}^2$): esôfago $4,8 \pm 1,5$ e $2,1 \pm 0,9$; jugal $4,5 \pm 1,2$ e $2,6 \pm 0,5$; *lag time* (mediana \pm desvio interquartil, em horas): esôfago $0,095 \pm 0,067$ e $0 \pm 0,065$; jugal $0,08 \pm 0,095$ e $0,11 \pm 0,06$; fluxo (média \pm DP, $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$): esôfago $161,6 \pm 15,38$ e $337,4 \pm 96,32$; jugal $120,9 \pm 17,02$ e $222,3 \pm 21,68$; *Q-total* (média \pm DP, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$): $254,29 \pm 14,66$ e $595,03 \pm 162,32$; jugal $194,79 \pm 21$ e $349,74 \pm 40,11$. O congelamento diminuiu a resistividade de ambos epitélios ($p < 0,05$). O *lag time* não diferiu entre as condições fresca e congelada ($p > 0,05$), entretanto o epitélio esofágico apresentou menor *lag time* que o jugal na condição congelado ($p = 0,019$). O fluxo foi maior no epitélio esofágico do que no jugal após o congelamento ($p < 0,05$); ambos epitélios apresentaram maior fluxo após congelamento em relação à condição fresco ($p < 0,05$). A quantidade de lidocaína permeada foi maior no epitélio esofágico em relação ao jugal, em ambas as condições; o congelamento também aumentou a quantidade de lidocaína permeada em ambos os epitélios em relação à condição de tecido fresco. Conclui-se que o epitélio esofágico não é um substituto equivalente ao epitélio jugal e que o congelamento a -

20°C por três semanas pode alterar os parâmetros de permeação da lidocaína, sendo contraindicado nos estudos deste fármaco.

Palavras-chave: Condutividade elétrica. Lidocaína. Mucosa esofágica. Mucosa bucal. Administração tópica.

ABSTRACT

Permeation assays are important to the development of topical formulations applied on buccal mucosa. Usually, swine buccal and esophageal epithelium are used as barriers for these assays, also, frozen epithelia have been used to optimize time. However, there is no consensus about the tissue freezing feasibility and its interference on permeation parameters. This study evaluated the permeation parameters of lidocaine hydrochloride gel through fresh buccal and esophageal porcine epithelium and after freezing and storage for 3 weeks at -20°C , to assess their interchangeability and possible alterations due to freezing and storage in the permeation parameters. After separation from the mucosa, buccal and esophageal epithelia were submitted to electrical resistivity evaluation to certify that integrity of the epithelium was maintained; some of these tissues were submitted to permeation assays and the other part was submitted to freezing and freezer storage at -20°C for 3 weeks. After this period, they were thawed and submitted to resistivity reevaluation and permeation test. Only epithelium that presented initial resistivity (under fresh condition) $\geq 3 \text{ K}\Omega/\text{cm}^2$ were used. Permeation was carried out in Franz-type diffusion cells at 37°C , under constant agitation and sink condition; lidocaine samples were withdrawn at 10 min intervals for 1 h, thereafter, lidocaine quantification was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The lag time, flux and amount of drug permeated were calculated. The obtained results for fresh and frozen tissues, respectively, were: electrical resistivity (mean \pm SD; $\text{K}\Omega/\text{cm}^2$): esophageal 4.8 ± 1.5 and 2.1 ± 0.9 ; buccal 4.5 ± 1.2 and 2.6 ± 0.5 ; lag time (mean \pm interquartile range, in hours): esophageal 0.095 ± 0.067 and 0 ± 0.065 ; buccal 0.08 ± 0.095 and 0.11 ± 0.06 ; flux (mean \pm SD, $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$): esophageal 161.6 ± 15.38 and 337.4 ± 96.32 ; buccal 120.9 ± 17.02 and 222.3 ± 21.68 ; cumulative amount (mean \pm SD, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$): esophageal 254.29 ± 14.66 and 595.03 ± 162.32 ; buccal 194.79 ± 21 e 349.74 ± 40.11 . Freezing process reduced both epithelial electrical resistivity ($p < 0.05$). Lag time was not different when both storage conditions were compared ($p > 0.05$), nevertheless, esophageal epithelium showed lower lag time than buccal epithelium after freezing process ($p = 0.019$). Esophageal epithelium presented higher flux than buccal epithelium after freezing process ($p < 0.05$), and higher flux was observed for frozen condition of both epithelia compared to fresh condition ($p < 0.05$). The amount of lidocaine permeated was higher through the esophageal epithelium compared to buccal epithelium under both conditions and freezing process increased the amount of drug permeated for both tissues. In conclusion, esophageal epithelium might not be used as substitute for buccal epithelium; additionally, freezing and storage at -20°C for 3 weeks can affect lidocaine permeation

parameters; therefore, these procedures are not recommended prior to lidocaine permeation assays.

Key-words: Electric conductivity. Lidocaine. Esophageal mucosa. Mouth mucosa. Topical administration.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
3. PROPOSIÇÃO	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
5. RESULTADOS	25
6. DISCUSSÃO	30
7. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

A administração de fármacos pela via oral é uma das formas mais convenientes de uso de medicamentos, pela sua facilidade de ingestão e comodidade ao paciente. Entretanto, a escolha desta via sujeita os fármacos ao metabolismo de primeira passagem e à degradação enzimática no trato gastrointestinal. A administração tópica através da mucosa bucal é uma via favorável, pois além de contornar estes dois fatores indesejáveis, apresenta fácil aceitação pelos pacientes por não ser invasiva e oferecer facilidade de aplicação (Shojaei 1998). De fato, a via sublingual tem sido muito utilizada para obtenção de efeitos sistêmicos por estes motivos, além de permitir rápido efeito (Goswami et al., 2008; Sivaraman e Banga, 2015).

Entretanto, a administração tópica pela mucosa jugal apresenta algumas desvantagens como a limitada área para absorção e relativa baixa permeabilidade, podendo ser necessário o uso de facilitadores de permeação, ou, ainda, de sistemas de liberação que possam promover a permeação controlada de medicamentos (Shojaei 1998; Senel et al., 2001; Giannola et al., 2007; Hassan et al., 2010).

Portanto, para que esta via possa ser amplamente utilizada, para cada fármaco, sistema de liberação e agente facilitador proposto são necessários estudos prévios de permeação *in vitro*, entre outros, que determinem a viabilidade do uso desta via para novas formulações. Como existe dificuldade de obtenção de tecido bucal humano para a realização de experimentos, e a questão ética a ser superada para seu uso, estudos *in vitro* lançam mão da similaridade histológica, estrutural, e de composição entre a mucosa jugal humana com a de suínos. Esta, por ser facilmente obtida, visto que seu abate é comum para o consumo alimentício, justifica sua utilização em estudos de permeação (Lesch et al., 1989; De Vries et al., 1991; Langoth et al., 2005; Kulkarni et al., 2010; Amores et al., 2014).

Como o epitélio jugal de suínos pode ser danificado durante a mastigação do animal e tem preparo difícil, muitos estudos propõem o uso de tecido esofágico, por sua similaridade histológica e de composição lipídica com o tecido jugal, além de apresentar preparo mais simples, com área mais ampla de superfície e maior integridade do tecido (Squier e Kremer, 2001; Diaz Del Consuelo et al., 2005a, b, c). Além disso, também é proposto o congelamento e armazenamento do epitélio usado em ensaios de permeação, ampliando a disponibilidade do tecido para estes estudos (Diaz Del Consuelo et al, 2005c).

Entretanto, Kulkarni et al. (2010) observaram alteração na permeabilidade para a buspirona, bupivacaína, antipirina e cafeína após congelamento da mucosa jugal por 24 h e Caon e Simões (2011) relataram maior permeabilidade para a mucosa esofágica em relação à jugal quando a triancinolona era usada na concentração de 1%, porém o mesmo não ocorreu quando a carbamazepina foi utilizada. Assim, parece não haver um consenso definitivo a respeito da intercambialidade destas mucosas e da interferência do tempo de congelamento sobre os parâmetros de permeação.

Em acréscimo, os parâmetros de permeação podem ser alterados quando a integridade do tecido não é mantida. Além da inspeção visual, a integridade pode ser avaliada por meio da medida da resistividade elétrica do tecido. Em 2015, Cubayachi et al. demonstraram que a permeação através do epitélio esofágico pode ser aumentada em 40% quando a resistividade elétrica deste tecido se encontrava abaixo de $2,5 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$.

A partir destes achados da literatura, este estudo se propôs a investigar a intercambialidade dos epitélios jugal e esofágico de suínos nas condições de tecido fresco e após congelamento por três semanas, avaliando a permeação de hidrogel de cloridrato de lidocaína e a resistividade elétrica dos tecidos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A busca por vias de administração e estratégias que resultem em melhor ação terapêutica e diminuição de efeitos adversos dos fármacos tem sido uma constante na história da medicina. O desenvolvimento do instrumental, bem como da farmacotécnica, proporcionando formas farmacêuticas com dissolução e liberação controladas do princípio ativo, tem contribuído para o aumento do arsenal terapêutico e eficácia no tratamento e prevenção de doenças. Entretanto, observa-se que tratamentos medicamentosos prolongados apresentam maior dificuldade de aceitação pelos pacientes, especialmente aqueles cuja via de administração demanda o uso de agulhas (Rothrock et al., 2013; Subramony, 2013).

Portanto, a administração tópica através da pele e mucosas constitui uma via interessante e nos últimos anos a mucosa jugal, mais especificamente, tem sido estudada e apontada como importante via para administração de fármacos (Sattar et al., 2014). Entre as vantagens desta via estão a possibilidade de uso para obtenção de efeitos tanto locais, quanto sistêmicos, além de proporcionar ação terapêutica constante, impedir a degradação pelo suco gástrico, evitar metabolismo hepático de primeira passagem e favorecer a colaboração do paciente, uma vez que a aplicação do medicamento pode ser feita de forma simples e não invasiva. Em acréscimo, o tecido mucoso apresenta alto índice de renovação celular, o que permite maior resistência tecidual e menor irritação, comparado a outras vias mucosas de administração (Hassan et al., 2010; Kulkarni et al., 2010; Morales e MacConville, 2014). Assim, é crescente o interesse no desenvolvimento de formulações para uso tópico através desta via, com melhoria da farmacocinética e biodisponibilidade de fármacos.

Entretanto, para amplo uso desta via de administração, alguns desafios ainda precisam ser superados, como a limitada área de absorção disponível e baixa permeabilidade através do tecido, consequente das propriedades de barreira da mucosa que precisam ser superadas pelos fármacos administrados através desta via (Senel et al., 2001; Giannola et al., 2007; Hassan et al., 2010).

A cavidade oral apresenta regiões com diversos tipos de mucosa, incluindo mucosa mastigatória, presente no palato duro e gengiva, mucosa do dorso da língua e a mucosa de revestimento (restante da boca). A mucosa mastigatória é composta de epitélio estratificado queratinizado, enquanto o dorso da língua apresenta epitélio especializado, com áreas queratinizadas e não queratinizadas. A mucosa de revestimento recobre o assoalho bucal, a porção inferior da língua e a superfície jugal, correspondendo a cerca de 60% da mucosa da

cavidade bucal, e é composta por epitélio estratificado não queratinizado (Morales e McConville, 2014). O conhecimento destas características é importante para a escolha do modelo de estudo para a permeação de fármacos, etapa imprescindível no desenvolvimento, controle de qualidade e avaliação de mudanças de formulações tópicas (Brasil, 2009), considerando-se a necessidade de compatibilidade entre o provável local de administração do fármaco na mucosa, a área de tecido usado no modelo de estudo e a natureza do fármaco avaliado.

A mucosa jugal de suínos tem sido utilizada em estudos *in vitro* para avaliação da permeação de fármacos devido a sua semelhança com a mucosa jugal humana em aspectos relacionados a permeabilidade, atividade enzimática, composição da barreira lipídica, aspectos histológicos e arranjo estrutural não queratinizado (Lesch et al., 1989; De Vries et al., 1991; Langoth et al., 2005; Kulkarni et al., 2010; Amores et al., 2014). Além disso, por ser um animal criado para consumo como alimento, há ampla disponibilidade de tecido e o seu aproveitamento para estudos é eticamente aceitável. Entretanto, o uso da mucosa jugal de suínos apresenta algumas desvantagens, como limitada área de superfície, qualidade duvidosa pela susceptibilidade a danos causados pela mastigação e complicadas obtenção e excisão por apresentar-se fortemente aderida ao tecido muscular subjacente, demandando dessa forma o uso de maior número de animais e maior tempo de preparo (Diaz Del Consuelo et al., 2005b).

A fim de contornar esses problemas, tem sido proposta a utilização do epitélio esofágico suíno como alternativa ao epitélio jugal em estudos *in vitro* de permeação de fármacos, pois o esôfago apresenta mucosa com maior integridade e área de superfície e preparação mais simples e menos dispendiosa (Diaz Del Consuelo et al., 2005b). Em acréscimo, a mucosa esofágica apresenta características histológicas semelhantes à jugal, sendo ambas revestidas por epitélio pavimentoso não queratinizado estratificado com as camadas basal, espinhosa, intermediária e superficial (Squier e Kremer, 2001; Diaz Del Consuelo et al., 2005c), com composição lipídica semelhante ao epitélio jugal (Diaz Del Consuelo et al., 2005b), embora a espessura do epitélio esofágico (409 μm) seja mais fina que a do epitélio jugal (767 μm) (Diaz del Consuelo et al., 2005c). Além disso, segundo Diaz Del Consuelo et al. (2005c), o congelamento do epitélio isolado (após sua separação do tecido conjuntivo adjacente), ou da mucosa como um todo, a -20°C ou a -196°C (em nitrogênio líquido, com posterior armazenamento em -20°C) por período inferior a três semanas, apesar de provocar pequenas alterações histológicas, não é capaz de interferir na permeação de fármacos, como o fentanil.

Desta forma, este tipo de preparo poderia facilitar o planejamento e desenvolvimento dos estudos de permeação.

Entretanto, Franz-Montan et al. (2016), avaliando os diferentes tipos de epitélio da cavidade bucal, observaram que o congelamento da mucosa jugal de porco a -20°C e -80°C por duas, três e quatro semanas levou à descamação das camadas superficiais e ao aparecimento de espaços esféricos nas camadas mais internas do epitélio (provavelmente pela formação de cristais de gelo e retração das células), em quantidade crescente com o aumento do tempo de preservação. Nesse estudo também foi avaliada a permeação do cloridrato de lidocaína após quatro semanas de conservação a -20°C e a -80°C , sendo relatado um aumento da sua permeação em relação ao tecido fresco. Como o cloridrato de lidocaína é um composto hidrofílico (coeficiente de partição octanol/água de 26,8 segundo Ueda et al., 1982), a maior permeação no tecido submetido ao congelamento poderia ser explicada justamente pelo aumento do espaço entre as células, uma vez que fármacos hidrofílicos são permeados através do espaço intercelular, enquanto que os lipofílicos conseguem atravessar o epitélio através das células que compõem o mesmo (Shojaei, 1998; Hassan et al., 2010; Sattar et al., 2014). As alterações encontradas histologicamente no epitélio após o congelamento indicam dano estrutural permanente pela alteração da matriz intracelular e da membrana celular pela formação de cristais de gelo dentro do tecido (Caon e Simões, 2011; Hadzija et al., 1992). Assim, o congelamento do tecido poderá ter maior ou menor interferência no perfil de permeação dependendo da natureza do fármaco utilizado.

Desta forma, as diferenças entre os estudos de Diaz Del Consuelo et al. (2005c) e Franz-Montan et al. (2016) com relação à permeação poderiam ser devidas ao tempo de armazenamento (três e quatro semanas, respectivamente) e à maior ou menor hidrofilicidade do fármaco utilizado. Entretanto, em função das alterações histológicas observadas por Franz-Montan et al. (2016) no epitélio jugal após congelamento, resta elucidar se há alterações no perfil de permeação após congelamento dos epitélios jugal e esofágico ou se o armazenamento do tecido oferece resultados similares e reprodutíveis aos obtidos com o tecido fresco.

Adicionalmente foi observado por Caon e Simões (2011) que o congelamento a -80°C por quatro semanas promove descamação superficial do epitélio e discreta alteração histológica (pela formação de cristais de gelo) nas mucosas jugal e esofágica de suínos. Também relataram que para a carbamazepina não houve diferença nos parâmetros de permeação (fluxo e coeficiente de permeação) entre as condições de tecido fresco e congelado, porém o tempo de retenção do fármaco foi maior nos tecidos congelados, provavelmente pela

retenção do fármaco nos espaços deixados pela formação de cristais de gelo durante o congelamento. Não foram observadas diferenças em todos os parâmetros quando foram comparadas as mucosas jugal e esofágica sob as mesmas condições de armazenamento. Entretanto, ao analisar a permeação de acetato triancinolona 0,1% (fármaco mais lipossolúvel) foi observado fluxo maior na mucosa esofágica do que na jugal, tanto na condição de mucosa fresca, quanto na congelada e, portanto, os resultados obtidos na permeação através da mucosa esofágica não podem ser extrapolados para a mucosa jugal. Desta forma, as características físico-químicas dos fármacos (lipo/hidrofiliabilidade e grau de ionização) podem interferir na permeação dos mesmos, devendo o modelo de estudo ser adequado a sua avaliação.

Um outro possível fator de interferência na permeabilidade e não avaliado nos estudos citados é a resistividade do tecido. De acordo com Cubayachi et al. (2015), a permeação de lidocaína e prilocaína não sofre interferência da resistividade do epitélio esofágico quando estes apresentam valores entre 2,8 a 12,7 $K\Omega/cm^2$. Para valores abaixo de 2,5 $K\Omega/cm^2$ a permeabilidade aumenta cerca de 40%.

Consequentemente, este estudo se baseia na hipótese de que o congelamento do tecido levaria a alterações no perfil de permeação, comparado ao tecido fresco, devido à alteração tecidual provocada pela formação de cristais de gelo durante o congelamento do tecido e posterior surgimento de espaços decorrentes do descongelamento destes cristais, e que não seria possível a comparação entre os perfis de permeação obtidos com epitélios jugal e esofágico, pois diferenças estruturais entre os tecidos oferecem disparidades nos parâmetros de permeação encontrados.

Considerando o amplo uso clínico dos anestésicos tópicos na cavidade bucal para reduzir a dor e o desconforto durante a punção e injeção dos anestésicos locais, e o interesse em sistemas de liberação de fármacos e promotores para o aumento da absorção, torna-se necessário estabelecer modelos adequados para o estudo de permeação desses fármacos (Diaz Del Consuelo et al., 2005c; Franz-Montan et al., 2016). Portanto, este estudo se propõe a comparar a permeabilidade dos epitélios jugal e esofágico suínos, nas condições fresca e congelada a $-20^{\circ}C$ durante três semanas, utilizando um dos anestésicos de uso tópico clínico mais difundido, o cloridrato de lidocaína (fármaco hidrofílico) para investigação da interferência do congelamento e armazenamento do epitélio, além da possibilidade de intercambialidade dos tecidos esofágico e jugal em estudos de permeação *in vitro*. Com base nos resultados obtidos espera-se contribuir para a normatização deste modelo de permeação,

permitindo maior controle de qualidade, previsão de comportamento e verificação de distribuição de princípios ativos.

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo geral: avaliar a permeabilidade dos epitélios de mucosa jugal e esofágica de suínos nas condições fresco e congelado por três semanas, como modelos para estudo de permeação *in vitro*.

Objetivos específicos: observar a influência do congelamento sobre os parâmetros de permeação de hidrogel de cloridrato de lidocaína, de caráter hidrofílico, nos epitélios jugal e esofágico de suínos e a interferência do congelamento sobre a integridade do tecido por meio da medida da resistividade tecidual. Adicionalmente, comparar os perfis de permeação obtidos para os dois tipos de epitélio, no intuito de estudar a possibilidade de extrapolação dos resultados obtidos com epitélio esofágico para comparação com resultados obtidos com epitélio jugal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Foram utilizados para o presente estudo: cloridrato de lidocaína (Sigma–Aldrich), carbopol, propilenoglicol, metilparabeno, trietanolamina e glicerina (Galena Química e Farmacêutica), acetonitrila grau HPLC (Merk®), água deionizada ultrapurificada (Milli-Q® system, Millipore), Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Thermo®, acoplado ao coletor automático Thermo® e interligados ao software Surveyor ChromQuest 5.0; Sistema Transdérmico Manual (Hanson Research Corporation, Chatsworth, CA, USA), mucosa esofágica e jugal de suínos, obtidas comercialmente do Frigorífico Angelelli® Ltda, Piracicaba-SP (certificado pela Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo - SIF 2259).

4.2 OBTENÇÃO E PREPARO DAS MUCOSAS ESOFÁGICA E JUGAL

Os esôfagos e as maxilas de porco (*Sus scrofa domestica*, da raça Landrace, com 5 meses de idade e pesando entre 75 e 80 Kg) foram comprados do Frigorífico Angelelli Ltda; estas estruturas foram transportadas em tampão fosfato salina - PBS (pH 7,4) para o laboratório em até 30 minutos após o abate dos animais.

A obtenção do epitélio do esôfago e da mucosa jugal foi realizada de acordo com o método descrito por Diaz Del Consuelo et al. (2005a, c). Para a obtenção do tecido jugal, as bochechas dos animais foram separadas do tecido adjacente com auxílio de lâmina de bisturi e lavadas com PBS, enquanto a obtenção do tecido esofágico se deu pelo isolamento da porção central do esôfago, seguido pela camada muscular com o auxílio de um bisturi e corte longitudinal para exposição do lúmen esofágico, o qual também foi submetido à lavagem com PBS. Posteriormente, ambas mucosas foram imersas em banho de água destilada a 60°C, por 2 minutos, sendo este aumento da temperatura incapaz de provocar alterações nas características histológicas ou no perfil de permeação do tecido (Nicolazzo et al., 2003). Após este período, o epitélio foi delicadamente separado do tecido conjuntivo (lâmina própria) por meio de uma espátula e as amostras de epitélio foram inspecionadas visualmente para a detecção de possíveis discontinuidades macroscópicas do tecido. Parte dos espécimes foi utilizada imediatamente após o preparo (tecido fresco) (n=19), enquanto que a outra parte foi armazenada por três semanas a -20 °C e então submetida aos ensaios de permeação (n=20).

4.2.1 Congelamento dos tecidos

Para o congelamento os espécimes foram embrulhados em filtro de celulose (Unifil, 80 g/m²) umedecido em PBS e em seguida envoltos em papel alumínio, acondicionados em embalagem plástica selada e armazenados durante três semanas em freezer com temperatura controlada de -20 ± 1 °C. Após o período de três semanas de congelamento os tecidos foram submetidos ao descongelamento por meio da imersão das amostras em PBS durante 15 minutos em temperatura ambiente. Após o descongelamento foram realizados os estudos de permeação, sendo utilizados espécimes de tecido de pelo menos três animais diferentes para cada experimento. Cada experimento foi realizado com n de 10 amostras por grupo (Franz-Montan et al., 2016).

4.3 MEDIDA DA RESISTIVIDADE

Após o preparo dos tecidos, os mesmos foram submetidos à inspeção visual e à medida da resistividade para certificação de sua integridade (Polat et al., 2011; Cubayachi et al., 2015).

As medidas de resistividade e o ensaio de permeação foram realizados em célula de difusão vertical de Franz com área de permeação de 1,77 cm² e volume do compartimento receptor de 7,0 mL (Sistema Transdérmico Manual, Hanson Research Corporation, CA, USA). Cada epitélio foi posicionado sobre a célula de Franz de forma que a camada basal do mesmo ficasse voltada para o compartimento receptor.

Os compartimentos doador e receptor da célula de Franz foram preenchidos com tampão PBS degaseificado, sendo posicionados eletrodos de Ag/AgCl nos compartimentos doador e receptor, em contato com um gerador de sinal Keysight 33220A (Agilent®), e um multímetro digital ET-2053DMM (Minipa®), respectivamente. Após o período de 60 minutos, sob agitação magnética (350 rpm), em banho-maria a 37°C para equilíbrio eletrolítico, foi aplicada corrente alternada com potência de 100 mV (RMS) e frequência de 10 Hz para a avaliação de resistividade. A corrente elétrica gerada foi medida no compartimento receptor pelo multímetro, sendo a resistividade calculada de acordo com a lei de Ohm (Eq. 1):

$$R = (\Delta P / I) / A \text{ (Eq. 1)}$$

Onde P corresponde à diferença de potencial do Sistema (mV); I à intensidade de corrente elétrica medida em μ A; e A à área da membrana (1,77 cm²) (Cubayachi et al, 2015).

Os tecidos que apresentaram resistividade inicial igual a ou maior que $3 \text{ K}\Omega/\text{cm}^2$ foram utilizados nas etapas seguintes do experimento, pois valores inferiores a este podem indicar ausência de integridade do tecido (Cubayachi et al, 2015).

As medidas de resistividade foram realizadas em 20 espécimes de cada tecido, jugal e esofágico. Após essas medidas, em 10 exemplares de cada tecido a área que ficou sobre a célula de Franz foi demarcada com auxílio de papel auto-adesivo, sendo os epitélios submetidos a congelamento conforme descrição no item 4.2.1. Após descongelamento, esses espécimes foram colocados na célula de difusão vertical de Franz na mesma posição usada para a medida inicial da resistividade (tendo como referência a marcação feita) e submetidos a nova medida de resistividade e, em seguida, ao ensaio de permeação.

Os tecidos que não foram congelados foram imediatamente submetidos ao ensaio de permeação, como descrito no item 4.5.

4.4 PREPARO DO HIDROGEL DE LIDOCAÍNA

O anestésico (lidocaína 5%) foi micronizado e levigado em uma pequena quantidade de propilenoglicol, em seguida essa mistura foi adicionada ao gel de carbopol, cuja composição se encontra listada no Quadro 1, mantido sob agitação constante até obtenção de gel uniforme, de acordo com o descrito por Silva et al. (2008). O pH do gel foi de 4,7.

Quadro 1 - Composição do gel base para preparação de hidrogel de lidocaína (Silva et al., 2008).

Componente	Concentração	Função
Carbopol	2%	Agente geleificante
Propilenoglicol	5%	Solvente e umectante
Metilparabeno	0,2%	Conservante
Glicerina	8%	Umectante e emoliente
Trietanolamina	q.s.p. pH 7,0	Agente alcalinizante
Água	q.s.p. 100 mL	Solvente

4.5 ENSAIO *IN VITRO* DE PERMEACÃO DA LIDOCAÍNA ATRAVÉS DOS EPITÉLIOS DE MUCOSA JUGAL E ESOFÁGICA DE PORCO EM CÉLULA DE DIFUSÃO VERTICAL TIPO FRANZ

Os ensaios de permeação com o hidrogel de cloridrato de lidocaína foram realizados em célula de difusão vertical tipo *Franz* (descrita no item 4.3).

Logo após a realização da medida da resistividade dos epitélios, a solução tampão foi substituída no compartimento doador por 300 mg de hidrogel de cloridrato de lidocaína 5%, de forma oclusiva, em situação de dose infinita. Durante todo o experimento a concentração do anestésico no compartimento receptor não ultrapassou 10% da sua solubilidade máxima ($0,24 \pm 0,04$ g/mL) em PBS, caracterizando assim a condição “sink”, que garante a solubilidade do fármaco nestas condições experimentais.

Os ensaios de permeação foram realizados durante um período de 1 hora, à temperatura controlada de 37°C e sob agitação constante (350 rpm). Em intervalos de 10 minutos foram retiradas alíquotas da solução receptora (300 µL) para quantificação da lidocaína permeada (método descrito a seguir). Ao compartimento receptor foram adicionados volumes idênticos aos retirados, os quais foram utilizados para o cálculo da diluição realizada. Foram utilizados 10 espécimes de cada tipo de epitélio em cada experimento, provenientes de, no mínimo, três animais.

A quantificação de lidocaína nos ensaios de permeação foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE, utilizando-se o de Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Thermo®, acoplado ao coletor automático Thermo® e interligados ao software Surveyor ChromQuest 5.0. As condições cromatográficas utilizadas durante o processo de desenvolvimento e validação do método, bem como para a avaliação das amostras coletadas, estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2 - Condições cromatográficas utilizadas para validação da metodologia analítica para quantificação de lidocaína.

Amostra	Lidocaína**
Fase móvel	Acetonitrila / Tampão (25mM NH ₄ OH, ajustado ao pH 7,0 com H ₃ PO ₄), (40:60 v:v)
Volume de injeção	20 µL
Fluxo	1,2 mL/min
Detector (λ)	Ultravioleta (UV), λ = 220nm
Coluna cromatográfica	Phenomenex, Gemini, C ₁₈ fase reversa 5µm, 150 x 4,60mm

**Adaptado de Franz-Montan et al. (2015)

As condições analíticas e a metodologia de quantificação dos anestésicos foram validadas segundo parâmetros estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2017), de acordo com o Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, de forma a atender às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Foram avaliados os parâmetros linearidade, especificidade, exatidão, precisão, limite de quantificação e detecção. Uma curva de calibração foi gerada (n=3), utilizando seis diferentes concentrações do cloridrato de lidocaína (0,1-200 µg/mL), preparadas a partir de uma solução estoque de cloridrato de lidocaína dissolvida em PBS (pH 7,4). Estas concentrações foram analisadas em triplicata durante três dias consecutivos. A linearidade foi avaliada pela regressão linear do pico da área pela concentração da droga ($r^2=0,999$). Concentrações baixa, média e alta de lidocaína (10, 50 e 200 µg/mL) também foram analisadas em triplicata durante três dias consecutivos para determinação da acurácia e precisão inter e intradia (96,05%, 100,5%). O limite de quantificação foi 0,80 µg/mL e o limite de detecção foi de 0,24 µg/mL para este método analítico.

Após a quantificação por CLAE, foi construído um gráfico a partir da quantidade de anestésico tópico acumulado no compartimento receptor *versus* tempo (intervalos de tempo de cada coleta). A partir deste gráfico, foram calculados o tempo necessário para permeação inicial do anestésico (*time lag*), o fluxo e coeficiente de permeabilidade. A inclinação da porção linear dos gráficos (coeficiente angular da reta) representa o fluxo de penetração do anestésico através da mucosa e a sua intersecção com o eixo das abscissas permite determinar o valor do tempo de latência (*time lag*).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, foram realizados os testes de D'Agostino-Pearson para verificação da normalidade dos dados e Bartlett para avaliação da homocedasticidade de variâncias. Os resultados foram submetidos às seguintes transformações: resistividade em raiz quadrada, fluxo em log e quantidade total de lidocaína permeada em recíproca. Os resultados da medida de resistividade foram submetidos à ANOVA de duas vias para medidas repetidas e teste de Bonferroni para comparações múltiplas (para cada tecido, comparando fresco e congelado) e ANOVA de duas vias e Bonferroni para comparações múltiplas (para tecidos diferentes na mesma condição, fresco ou congelado); a análise dos resultados de lag time foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis; os resultados de fluxo e quantidade total de lidocaína permeada foram analisados por ANOVA e teste de Tukey; a quantidade de lidocaína permeada ao longo do tempo foi submetida à análise de regressão linear. Estas análises foram realizadas pelo software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, USA), com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 MEDIDA DA RESISTIVIDADE

Não houve diferença significativa na resistividade elétrica entre epitélio esofágico e epitélio jugal quando na mesma condição de armazenamento, fresco ($p>0,9999$) ou após três semanas de congelamento a -20°C ($p=0,5135$). Entretanto, valores reduzidos de resistividade elétrica foram observados após o congelamento, em relação ao valor inicial, tanto para o epitélio jugal ($p=0,0026$), quanto para o esofágico ($p<0,0001$) (Figura 1).

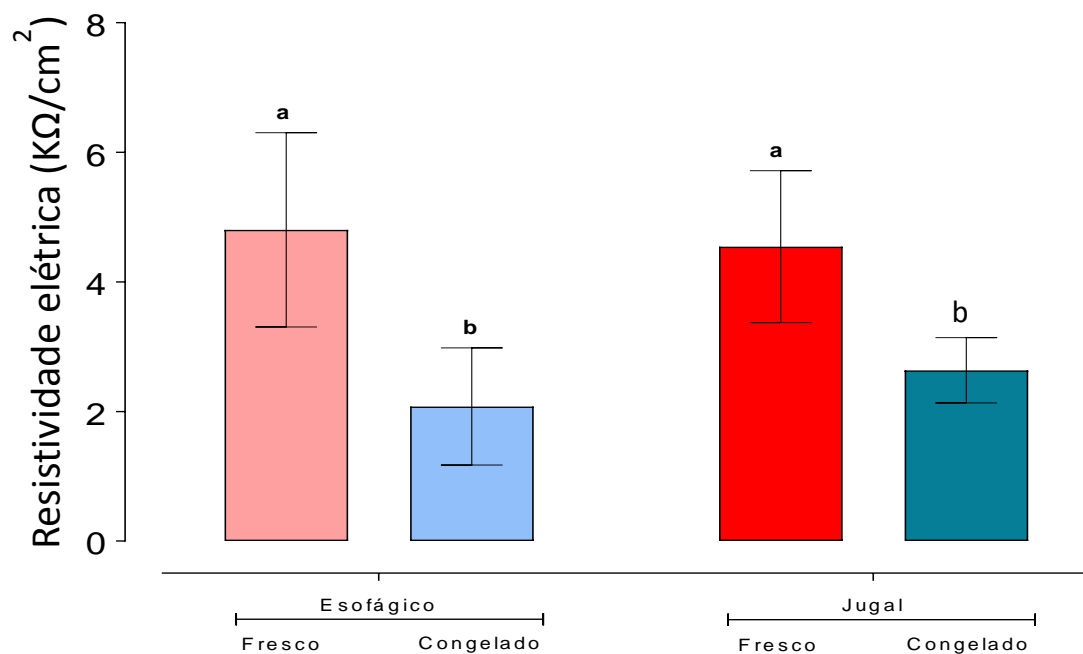


Figura 1 - Resistividade elétrica (média \pm DP; KΩ/cm²) dos epitélios esofágico e jugal pré e pós-congelamento por três semanas a -20°C . ($n=9-10$; ANOVA bicaudal para medidas repetidas e Bonferroni para comparações múltiplas, esôfago fresco x congelado: $p<0,0001$; jugal fresco x congelado: $p=0,0026$. ANOVA bicaudal e Bonferroni para comparações múltiplas: tecido fresco esôfago x jugal: $p>0,9999$; tecido congelado esôfago x jugal: $p=0,5135$).

5.2 ENSAIO *IN VITRO* DE PERMEAÇÃO DA LIDOCAÍNA

Os resultados de permeação calculados encontram-se sumarizados na Tabela 1. O *lag time* não diferiu entre os epitélios esofágico e jugal na condição de tecido fresco ($p>0,9999$). O congelamento não alterou o *lag time* para o epitélio jugal ($p>0,9999$), entretanto, na condição de tecido congelado o epitélio esofágico apresentou menor *lag time* do que o epitélio jugal ($p=0,0186$).

Tabela 1 - Parâmetros de permeação de hidrogel de cloridrato de lidocaína através dos epitélios esofágico e jugal de porco nas condições fresco e após congelamento por três semanas a -20°C ($n=9-10$).

Epitélio	Condição	J_{ss} ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	<i>Lag time</i> (h)	R^2
		Média \pm DP	Mediana \pm desv. Interq.	
Esofágico	Fresco	161,6 \pm 15,38 ^{ac}	0,095 \pm 0,067 ^{ab}	0,99
	Congelado	337,4 \pm 96,32 ^b	0 \pm 0,065 ^b	0,99
Jugal	Fresco	120,9 \pm 17,02 ^a	0,08 \pm 0,095 ^{ab}	0,99
	Congelado	222,3 \pm 21,68 ^c	0,11 \pm 0,06 ^a	0,99

J_{ss} : fluxo de permeação dos anestésicos locais no estado estacionário; *Lag time*: tempo para início da permeação; R^2 : coeficiente de determinação do modelo de regressão linear. ANOVA / Tukey-Kramer (J_{ss}); Kruskal-Wallis (*Lag time*). Letras diferentes na mesma coluna indicam $p < 0,05$.

Na condição de tecido fresco, o fluxo de lidocaína através do epitélio esofágico não diferiu do observado através do epitélio jugal ($p=0,3255$). Após o congelamento ambos epitélios apresentaram aumento no fluxo, sendo maior o fluxo através do epitélio esofágico ($p<0,0001$). Além disso, pode-se observar que o período de congelamento a -20°C aumentou significativamente o fluxo de lidocaína, nos tecidos esofágico e jugal, quando comparados aos respectivos tecidos frescos (esofágico: $p<0,0001$; jugal: $p=0,0007$) (Figura 2).

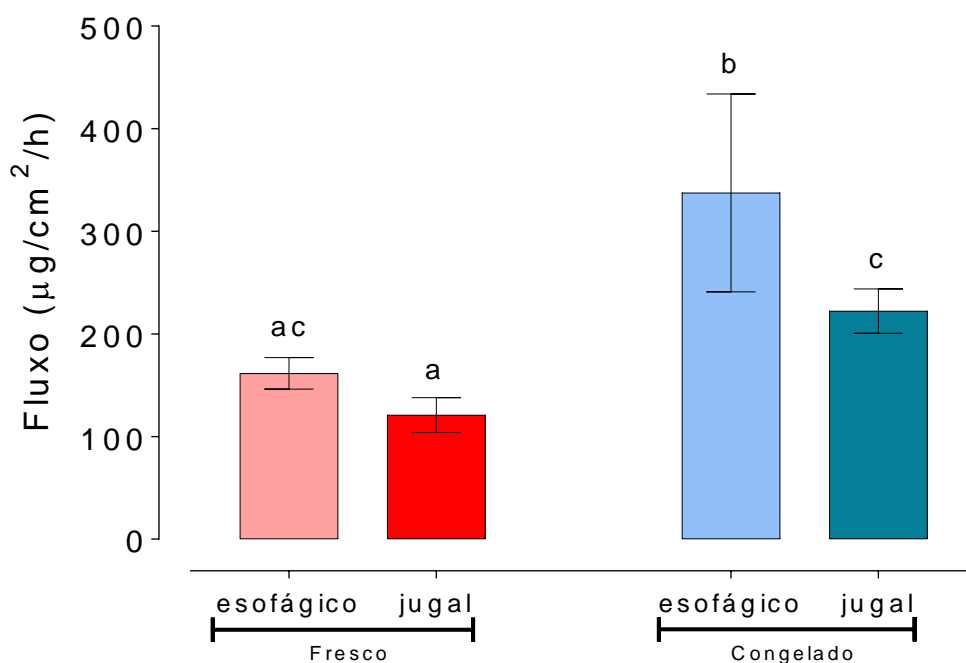


Figura 2 - Fluxo de lidocaína (média \pm DP, $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) através dos epitélios esofágico e jugal nas condições fresco e após congelamento por três semanas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($n=9-10$; ANOVA/Tukey; esôfago x jugal fresco: $p=0,3255$; esôfago x jugal congelado: $p<0,0001$; esôfago fresco x congelado: $p<0,0001$; jugal fresco x congelado: $p=0,0007$).

A permeação do hidrogel de cloridrato de lidocaína mostrou perfil linear sob condição de dose infinita, havendo aumento na quantidade de lidocaína permeada ao longo do tempo e após congelamento. (Tabela 1 e Figura 3). A análise de regressão linear mostrou aumento significativo de lidocaína permeada tanto através do epitélio esofágico ($p<0,0001$), quanto do epitélio jugal ($p<0,0001$), após o período de congelamento ($p<0,0001$). Adicionalmente, o epitélio esofágico apresentou maior quantidade de fármaco permeado que o epitélio jugal quando fresco ($p=0,0008$) e após o período de congelamento ($p<0,0001$).

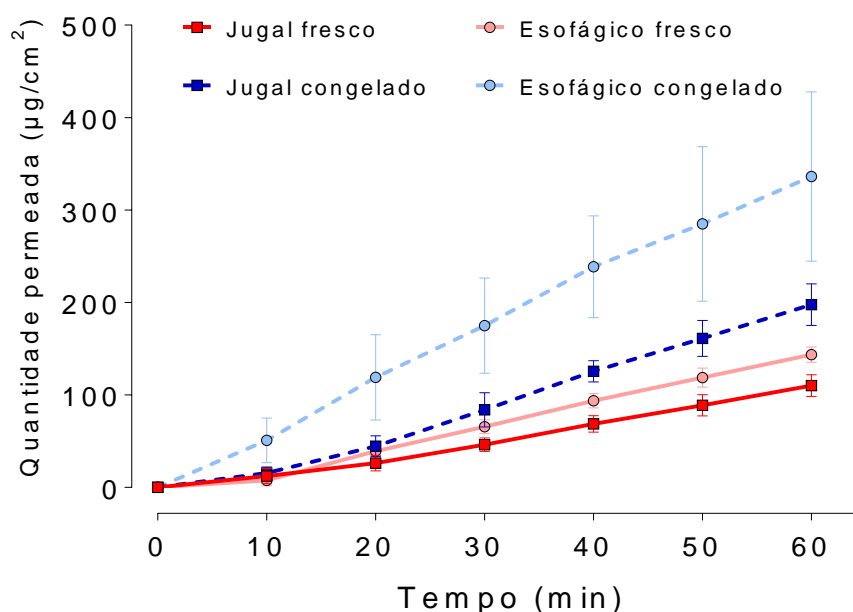


Figura 3 - Quantidade de lidocaína permeada (média \pm DP, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) através do epitélio esofágico ou jugal nas condições fresco e após congelamento por três semanas ($n=9-10$; Regressão linear: epitélios jugal x esofágico fresco: $p=0,0008$; jugal x esofágico congelado: $p<0,0001$; jugal fresco x jugal congelado: $p<0,0001$; esofágico fresco x esofágico congelado: $p<0,0001$).

A quantidade total de lidocaína permeada ao longo do tempo de análise foi maior no tecido esofágico em relação ao jugal em ambas as condições, fresca e congelada ($p<0,0001$). O congelamento aumentou a quantidade total de lidocaína permeada em relação ao tecido fresco tanto no epitélio esofágico, quanto no jugal ($p<0,0001$). Estes resultados são mostrados na Figura 4.

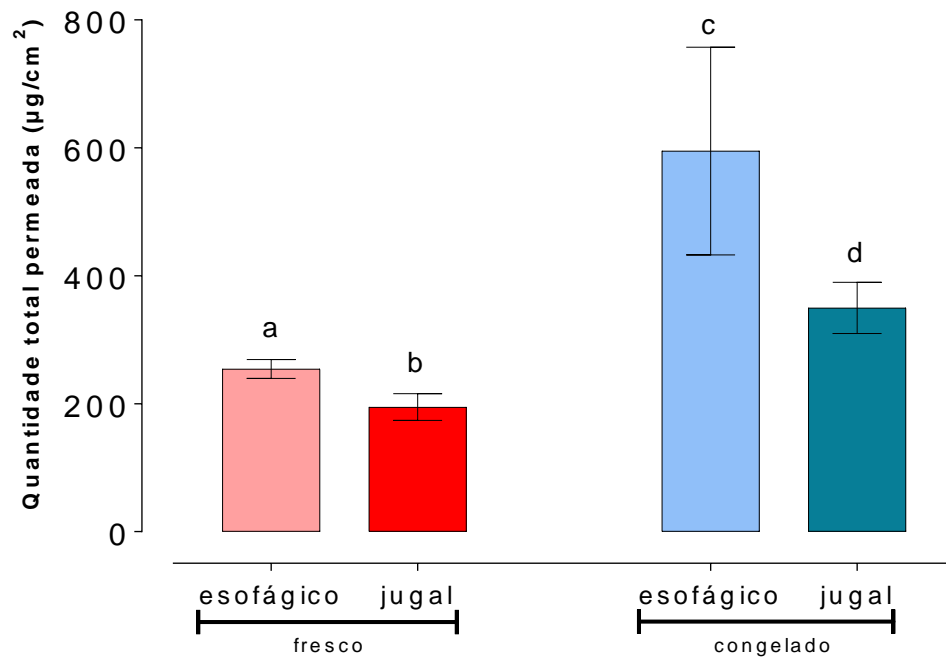


Figura 4 - Quantidade total de lidocaína permeada (média \pm DP, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) através do epitélio esofágico e jugal nas condições fresco e após congelamento por três semanas (n=9-10; ANOVA/Tukey: $p < 0,0001$ para todas as comparações).

6 DISCUSSÃO

A integridade dos tecidos usados em modelos de permeação de fármacos é fundamental para garantir a precisão dos resultados. Este aspecto tem sido avaliado por meio da medida da resistividade elétrica. Desde 1990 este parâmetro tem sido utilizado em estudos envolvendo a pele como tecido de permeação (Kasting e Bowman, 1990a,b; Polat et al., 2011) e mais recentemente também foi adaptado para avaliação de epitélio de mucosa (Cubayachi et al., 2015). Com relação a este último, Cubayachi et al. (2015) observaram valores de resistividade de 2,8 a 12,7 K Ω /cm² para epitélio esofágico fresco, relatando que neste intervalo a quantidade de droga permeada (cloridrato de prilocaína e de lidocaína) não sofria interferência deste parâmetro. Entretanto, quando os valores de resistividade eram inferiores a 2,5 K Ω /cm² havia um aumento de 40% na quantidade de droga permeada.

Os resultados obtidos para os tecidos frescos no presente estudo (média \pm DP, para os epitélios jugal [4,5 \pm 1,2 K Ω /cm²] e esofágico [4,8 \pm 1,5 K Ω /cm²]) estão dentro do intervalo relatado por esses autores. Após o congelamento por três semanas a -20 °C, ambos os tecidos apresentaram diminuição significativa de resistividade (média \pm DP, para os epitélios jugal [2,6 \pm 0,5 K Ω /cm²] e esofágico [2,1 \pm 0,9 K Ω /cm²]), acompanhada do aumento do fluxo e da quantidade de cloridrato de lidocaína permeada ao longo do tempo e da quantidade total. Estes resultados indicam possível dano à integridade da barreira epitelial. O aumento do fluxo de lidocaína permeada também foi relatado por Franz-Montan et al. (2016), após congelamento de epitélio jugal por quatro semanas, entretanto, neste estudo não foi avaliada a resistividade dos tecidos.

Outros autores, como Diaz del Consuelo et al. (2005c), relataram que o congelamento a -20 °C por tempo inferior a três semanas não implicou em alterações no perfil de permeação do citrato de fentanila. Da mesma forma, o congelamento a -80 °C por período inferior a um mês não implicou em alterações no fluxo do acetonido de triancinolona ou da carbamazepina, sendo estas drogas mais lipossolúveis que o cloridrato de lidocaína (Caon e Simões, 2011). Nossos resultados se assemelham aos relatados por Franz-Montan et al., 2016, no qual houve aumento do fluxo de lidocaína para o epitélio jugal após quatro semanas de congelamento. Provavelmente esta diferença de resultados se deva à diferença de lipossolubidade das drogas avaliadas; a lidocaína apresenta coeficiente de partição octanol/água de 26,8 (Ueda et al., 1982), enquanto a carbamazepina, a triancinolona a fentanila apresentam coeficiente de partição bem mais elevado, respectivamente de 2455, 263 e 13804 (Céondo, 2016).

O aumento do fluxo em epitélio jugal, observado por Franz-Montan et al (2016), e no presente estudo em epitélio jugal e esofágico, após o congelamento, pode ser devido à presença de espaços vazios consequentes à formação de cristais de gelo e da descamação do epitélio durante o congelamento, conforme relatado por estes autores. Possivelmente, o congelamento afetaria principalmente o espaço paracelular, via de permeação para fármacos hidrossolúveis como o cloridrato de lidocaína. Porém, este não seria um fator crítico para ensaios de permeação de formulações lipofílicas, como carbamazepina e acetonido de triancinolona (Caon e Simões, 2011) ou citrato de fentanila (Diaz Del Consuelo et al., 2005c).

Entretanto, Nicolazzo et al. (2003) não observaram diferença de fluxo de estradiol e cafeína, respectivamente de caráter lipofílico e hidrofílico, através do epitélio bucal suíno nas condições fresco e após congelamento a -20 °C por período de um mês. Apesar disso, relataram ocorrência de sinais de morte celular após congelamento. Assim, além do coeficiente de partição, outros fatores podem ser importantes para a permeação como o coeficiente de difusão, o tamanho e a forma das moléculas (Barry, 2002), bem como os constituintes da preparação, os quais podem potencializar a permeação, aumentando o fluxo, o tempo de início da permeação e a quantidade de fármaco permeado.

Ainda de relevância para obtenção dos parâmetros de permeação é o período de avaliação, que de acordo com Shah (1993) deve ser superior a três vezes o *lag time* para não haver distorção dos valores de fluxo, o que foi seguido no presente estudo (maior *lag time* 0,11 h para o epitélio esofágico, correspondendo a 6,6 min e tempo total de permeação de 60 min).

Outro parâmetro alterado após o congelamento, no presente estudo, foi o tempo para o início da permeação do epitélio esofágico, que sofreu diminuição em relação ao jugal sob a mesma condição, o que está em acordo com o maior fluxo observado para aquele tecido. Embora o fluxo tenha sido maior em ambos os epitélios na condição congelada em relação à condição fresca, não foi observada diferença no *lag time* para o mesmo tecido em diferentes condições. Este achado pode ser devido à variabilidade dos resultados de *lag time* obtidos.

A literatura também mostra discrepância entre os estudos a respeito do tempo máximo de congelamento. Enquanto Diaz Del Consuelo et al. (2005c) e Nicolazzo et al. (2003) não observaram interferência na permeação através de epitélio esofágico e jugal em período de congelamento (-20 °C) de até três e quatro semanas, respectivamente, Franz-Montan et al. (2016) observaram aumento na permeação de epitélio jugal com quatro semanas de congelamento. Para as mucosas esofágica e jugal como um todo (envolvendo epitélio e

conjuntivo) a discrepância é ainda maior; Caon e Simões (2011) não observaram alterações significativas no fluxo após três semanas de congelamento, enquanto Kulkarni et al. (2010) relataram alteração de permeabilidade para a buspirona, bupivacaína, antipirina e cafeína após congelamento da mucosa a -20 °C por 24 h quando o meio utilizado era PBS ou tampão Krebs-Ringer bicarbonato. Estes resultados, juntamente com os observados no presente estudo mostram a dificuldade de extrapolar resultados obtidos com distintos fármacos, métodos de processamento dos tecidos e condições de armazenamento.

Em acréscimo, diferenças na composição da formulação também podem alterar os parâmetros da permeação. Assim, enquanto Cubayachi et al. (2015) obtiveram, em epitélio esofágico fresco, fluxo de $0,6 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ (equivalente a $36 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$) para a lidocaína 2,5% em hidrogel de hidroxipropil metilcelulose com pH 5,8, a 35 °C, no presente este estudo foi observado fluxo de $161,6 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ para a lidocaína a 5% em hidrogel de carboximetilcelulose com pH 4,7, a 37 °C. Ainda, a condução do estudo de forma oclusiva (com a colocação de uma lâmina de vidro sobre o hidrogel, sob pressão), como foi realizado em nosso estudo, também pode alterar o fluxo. Nesta condição, no presente experimento também foi observado maior fluxo de lidocaína através do epitélio jugal fresco ($120,9 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$) em comparação ao obtido por Franz-Montan et al. (2016) ($47,7 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$), que não utilizaram esse recurso, embora a formulação utilizada fosse exatamente a mesma. Da mesma forma, no presente estudo o tempo de início da permeação foi menor (0,08 h) em relação ao observado por Franz-Montan et al. (2016) (0,24 h).

No presente estudo foi observada maior quantidade de fármaco permeado ao longo do tempo e total através do epitélio esofágico em comparação ao epitélio jugal nas condições de tecido fresco e congelado. Para o tecido congelado foi também observado maior fluxo no epitélio esofágico. Estes achados são interessantes, pois contrariam a noção comum de que estes tecidos são intercambiáveis. De fato, Diaz Del Consuelo et al. (2005c) não observaram diferença nos parâmetros de permeação da fentanila entre estes dois tipos de epitélio. E embora Caon e Simões (2011) também não tenham observado diferenças na permeação de carbamazepina através das mucosas esofágica e jugal, em ambas condições, verificaram que a retenção da carbamazepina na mucosa congelada é maior. Para a triancinolona observaram que na concentração de 0,1% a mucosa esofágica apresentava maior permeabilidade, assim como observado por Caon e Simões (2011), que mostraram maior fluxo da triancinolona para o epitélio esofágico, tanto na condição fresca, quanto congelada.

Estes achados mostram que, embora apresentem características histológicas comuns e semelhança estrutural (Diaz Del Consuelo et al., 2005c; Caon e Simões, 2011) e de composição lipídica (Diaz Del Consuelo et al., 2005b) não é possível assumir de antemão a intercambialidade dos epitélios esofágico e jugal com relação a permeação de um fármaco, baseado no perfil de outro, ainda que apresentem características farmacológicas semelhantes. Assim, é prudente conduzir uma avaliação prévia do perfil de permeação da droga nos tecidos previamente à avaliação do potencial de interferência de agentes promotores ou de sistemas de liberação de fármacos.

Especificamente para o cloridrato de lidocaína na forma de gel, a mucosa esofágica não substitui de forma aceitável a mucosa jugal e apesar da conveniência do congelamento dos tecidos bucais para a realização de experimentos, tendo em vista a limitada disponibilidade de tecido fresco, esta não seria uma prática recomendada. O tempo de três semanas de congelamento aumentou de forma significativa a quantidade de fármaco permeado. Estes resultados mostram a necessidade de outros estudos a fim de estabelecer se tempos de congelamento inferiores interferem nos parâmetros de permeação deste fármaco.

7 CONCLUSÃO

Considerando que após o congelamento por três semanas houve diminuição da resistividade elétrica e aumento do fluxo e da quantidade de lidocaína permeada, total e ao longo do tempo, este tipo de procedimento deve ser evitado em estudos de permeação com este fármaco.

Ainda, embora na condição de tecido fresco o fluxo através dos epitélios jugal e esofágico não tenham diferido, a quantidade de lidocaína permeada foi maior no epitélio esofágico que no epitélio jugal, indicando que o epitélio esofágico não poderia ser um substituto fidedigno do epitélio jugal para ensaios de permeação através de tecidos bucais com este fármaco.

REFERÊNCIAS*

- Amores S, Lauroba J, Calpena A, Colom H, Gimeno A, Domenech J. A comparative ex vivo drug permeation study of beta-blockers through porcine buccal mucosa. *Int J Pharm.* 2014;468(1-2):50-4.
- Barry B. Transdermal drug delivery. In: Aulton ME (editor). *Pharmaceutics: the science of dosage form design*. 2.ed. New York: Churchill Livingstone, 2002. p.499-533.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Pós-registro de medicamentos. Resolução – RDC nº 48, 2009.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução – RDC nº 166, 2017.
- Céondo GmbH. Cheméo: High quality chemical properties. 2016. [acesso em 2017 Dez 12]. Disponível em: <https://www.chemeo.com/>.
- Caon T, Simões CMO Effect of freezing and type of mucosa on ex vivo drug permeability parameters. *AAPS PharmSciTech.* 2011;12(2):587-92.
- Cubayachi C, Couto RO, de Gaitani CM, Pedrazzi V, Freitas Od, Lopez RF. Needle-free buccal anesthesia using iontophoresis and amino amide salts combined in a mucoadhesive formulation. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015;136:1193-201.
- De Vries ME, Bodde HE, Verhoef JC, Junginger HE. Developments in buccal drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1991;18:271-303.
- Diaz Del Consuelo I, Falson F, Guy RH, Jacques Y. Transport of fentanyl through pig buccal and esophageal epithelia in vitro: influence of concentration and vehicle pH. *Pharm Res.* 2005a;22(9):1525-9.
- Diaz Del Consuelo I, Jacques Y, Pizzolato GP, Guy RH, Falson F. Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers. *Arch Oral Biol.* 2005b;50(12):981-7.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Diaz Del Consuelo I, Pizzolato GP, Falson F, Guy RH, Jacques Y. Evaluation of pig esophageal mucosa as a permeability barrier model for buccal tissue. *J Pharm Sci.* 2005c;94(12):2777-88.

Franz-Montan M, Baroni D, Brunetto G, Sobral VR, da Silva CM, Venâncio P, Zago PW, Cereda CM, Volpato MC, de Araújo DR., de Paula E, Groppo FC. Liposomal lidocaine gel for topical use at the oral mucosa: characterization, in vitro assays and in vivo anesthetic efficacy in humans. *J. Liposome Res.* 2015; 25, 11–19.

Franz-Montan M, Serpe L, Martinelli CC, da Silva CB, Santos CP, Novaes PD, Volpato MC, de Paula E, Lopez RF, Groppo FC. Evaluation of different pig oral mucosa sites as permeability barrier models for drug permeation studies. *Eur J Pharm Sci.* 2016;81:52-9.

Giannola LI, De Caro V, Giandalia G, Siragusa MG, Campisi G, Florena AM, Ciach T. Diffusion of naltrexone across reconstituted human oral epithelium and histomorphological features. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007;65(2):238-46.

Goswami T, Bhaskara J, Xiaoling L. Sublingual Drug Delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2008;25(5):449–84.

Hadzija BW, Ruddy SB, Ballenger ES. Effect of Freezing on Iontophoretic Transport Through Hairless Rat Skin. *J Pharm Pharmacol.* 1992;44:387-90.

Hassan N, Ahad A, Ali M, Ali J. Chemical permeation enhancers for transbuccal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010;7(1):97-112.

Kasting GB, Bowman LA. DC electrical properties of frozen, excised human skin. *Pharm Res.* 1990;7(2):134-43.

Kasting GB, Bowman LA. Electrical analysis of fresh, excised human skin: a comparison with frozen skin. *Pharm Res.* 1990;7(11):1141-6.

Kulkarni U, Mahalingam R, Pather I, Li X, Jasti B. Porcine buccal mucosa as in vitro model: effect of biological and experimental variables. *J Pharm Sci.* 2010;99(3):1265-77.

Langoth N, Bernkop-Schnürch A, Kurka P. In vitro evaluation of various buccal permeation enhancing systems for PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide). *Pharm Res.* 2005;22(12):2045-50.

- Lesch CA, Squier CA, Cruchley A, Williams DM, Speight P. The permeability of human oral mucosa and skin to water. *J Dent Res.* 1989;68(9):1345-9.
- Morales JO, McConville JT. Novel strategies for the buccal delivery of macromolecules. *Drug Dev Ind Pharm.* 2014;40(5):579-90.
- Nicolazzo JA, Reed BL, Finnin BC. The effect of various in vitro conditions on the permeability characteristics of the buccal mucosa. *J Pharm Sci.* 2003;92(12):2399-410.
- Polat BE, Figueroa PL, Blankschtein D, Langer R. Transport pathways and enhancement mechanisms within localized and non-localized transport regions in skin treated with low-frequency sonophoresis and sodium lauryl sulfate. *J Pharm Sci* 2011;100(2): 512-529.
- Rothrock JF, Freitag FG, Farr SJ, Smith EF. A review of needle-free sumatriptan injection for rapid control of migraine. *Headache.* 2013;53 Suppl 2:21-33.
- Shah J. Analysis of permeation data: evaluation of lag time method. *Int J Pharm.* 1993;90(2):161-9.
- Sattar M, Sayed OM, Lane ME. Oral transmucosal drug delivery--current status and future prospects. *Int J Pharm.* 2014;471(1-2):498-506.
- Senel S, Hincal AA. Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. *J Control Release.* 2001;72(1-3):133-44.
- Shojaei A.H. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *J Pharm Pharmaceut Sci.* 1998;1:15-30.
- Silva ALR, Franz-Montan M, Groppo FC, Volpato MC, Ranali J, Fraceto LF, de Paula E. Pharmaceutical composition comprising a local anesthetic and a carboxyvinyl polymer. International Patent #WO/2008/138089.
- Sivaraman A, Banga AK. Formulation and evaluation of sublingual delivery of piroxicam using thermosensitive polymer with an inverted Franz diffusion cell. *J Pharm Pharmacol.* 2016;68(1):26-35.
- Squier CA, Kremer MJ. Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2001;29:7-15.
- Subramony, J. A. Needle free parenteral drug delivery: leveraging active transdermal technologies for pediatric use. *Int J Pharm.* 2013;455(1-2): 14-18.

Ueda I, Oguchi K, Arakawa K. True oil/water partition coefficients of procaine and lidocaine and estimation of their dissociation constants in organic solvents. *Anesth Analg*. 1982;61(1):56-61.